

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 16/00		8318-4H	
		8318-4H	
		8318-4H	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-514437
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月10日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12039
 (87) 国際公開番号 WO94/13806
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日
 (31) 優先権主張番号 990, 263
 (32) 優先日 1992年12月11日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

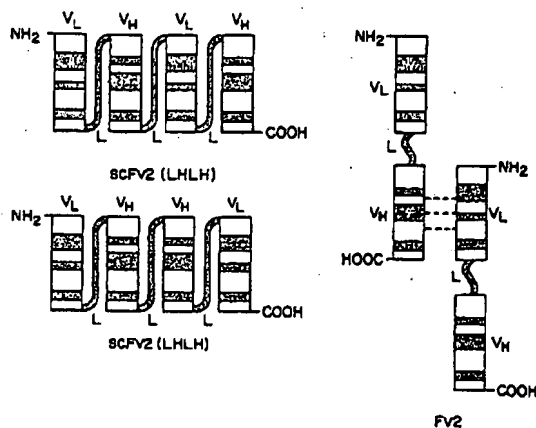
(71) 出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030
 (72) 発明者 メゼス, ビーター エス.
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25
 (72) 発明者 ゴーリー, プライアン ビー.
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713
 (74) 代理人 弁理士 石田 敏 (外3名)

(54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57) 【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



特許(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは：
 - (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
 - (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
 - (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー；
 を含んで成る、多価の一本鎖抗体。
2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列
 Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys
 Asp Leu
 を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。
3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。
4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。
5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは：
 - (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
 - (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー；
- を含んで成る、DNA配列。
6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

特許(内容に変更なし)

明細書

多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データベースは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとつてのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、*J. Immunol.*, **137**: 1066-1074 (1986)；Sunら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 214-218 (1987)；Nishimuraら、*Cancer Res.*, **47**: 999-1005 (1987)；及びLieら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとつて必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV_Lと一本のV_Hとにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカー

一 (米国特許第 4,946,778号) により連結された V_L-L-V_L ポリペプチドを成しており、ここで L はペプチドリンカーを設けている。 V_L と V_H ドメインが配向 V_H-L-V_L である $scPv$ が米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べて $scPv$ は一つのそれを有するため、 $scPv$ は2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有する $scPv$ の構築体を得ることが有利であろう。加えて、領的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベースを増加可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体捕獲を可能とする二価特異的である多価 $scPv$ を獲得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の V_L と一本の V_H ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の軽鎖可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；
を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；
を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図面の簡単な説明

図1は、 $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ (LHLH) と $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型 Pv 一本鎖抗体 ($Pv2$) を示す。

図2は CC49V₁ のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V₁ のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V₂ のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V₂ のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHHLにおけるCC49一本鎖抗体LHHLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL301T及びpSL301HTの構築を示す。

図9はプラスミド p49LHHLの構築を示す。

図10はプラスミド p49LHLHの構築を示す。

図11はCC49IgG、CC49scPv2及びCC49scPvを用いた、競合因子としてビオチニル化 CC49IgGを用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に超入れる。

核酸、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらはIUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」($scPv$)又は「抗体フラグメント」なる語は、 V_L-L-V_H により表わされる、ペプチドリンカー (L) により V_H ドメインに連結された V_L ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_L と V_H ドメインとの順序は逆であってよく、 V_H-L-V_L として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$; $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$; $V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L$;
又は

$V_H-L-V_L-L-V_L-V_H$

の V_L と V_H ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 V_L と V_H ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ (LHLH) 及び $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型 Pv 一本鎖抗体 ($Pv2$) も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された Kabatらの Sequences of Proteins of Immunological Interest 第4版 (1981) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できよう。例えば、カタログ ATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20308 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2~3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の負荷の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_H及びV_Lドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願WO 90/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00692に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開WO 90/04410及びWO 89/00692に

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantollanoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXhoI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンを変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである:

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

このリンカーは一般に10~60のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10~30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12~30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15~25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(*E. coli*)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSanbrockら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. セレビジェ(*S. cerevisiae*)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

おいてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_H及びV_Lドメインである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lをコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V_HとV_Lドメインを連結するための適当なリンカーは、V_HとV_Lドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV_H及びV_Lドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に記入される米国特許第4,948,778号に開示の方法により獲得できよう。この第4,948,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できよう。

好ましくは、V_HとV_Lドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(*Pichia pastoris*)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/0又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSVL及びpKSV-10(Pharmacia), pBPV-1/pML2d(International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウイルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処置し、次いで任意の様々な方法、例えばSanbrockら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換え DNA 技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる拘束的な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成される。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮される。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を執行することにより達成される。不溶性であり、且つ屈折体 (refractile bodies)、通称封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばクアニジーン-HCl による可溶性、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できうる。

IGP	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MBS	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCPV	SCPV をコードする DNA 配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scPv	一本鎖 P _v イムノグロブリンフラグメントモノマー
scPvs	共有結合した一本鎖 P _v イムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)
TTBS	ツイーン 20 洗浄液
V _H	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V _L	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459 として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は 1 又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表面で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって抱合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

略語

BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Tris	プロパン (1, 3-ビス (トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ) プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖 P _v ダイマー

CC49FAB: 重鎖の N-末端領域に連結している完全軽鎖より成る CC49 の抗原結合性領域。

CC49scPv: ペプチドリンカーにより連結されている CC49 抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している 2 つの CC49scPv。Fv の後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6 は六量体の多量体を意味する。

CC49scPv2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本の CC49V_H ドメインと 2 本の V_L ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_H (L) と V_H (H) ドメインとを連結し合わせるのに 6 つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHHL, LLHH, HLLH, HLHL 及び HLLL。

プラスミド

pSCPV UHM: 25 のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49 の可変軽鎖と CC49 可変重鎖とより成る scPv についてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scPv2 LHLH 又は LHHL 生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる。Sanbrook ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第 2 版 (1989) 及び Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準のβ-シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40μlの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm(OD₂₆₀)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BW, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Union Carbide Corp., Chicago)の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefler Scientific Instruments,

より測定した。scPv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20μl)を、非還元用サンプル調製バッファ-Seprazol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Dalichi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリアントブルーR-250(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており(Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P.PVDF(ポリビニリデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一面の陽極バッファ#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM濾紙のシートを陽極バッファ#1の中に浸し、そしてその電

CA)を用いて溶解させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200μlのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25μlの試験抗体及び25μlのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余剰な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscPvによる競合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は濃LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50μl(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scPv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404~450nmでの光学密度スキャンに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファ(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ボルトに範囲した)を用いて30分で進められた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化PAID 14溶液とした(10μg/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂·H₂O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

ての蓋質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120 μ lを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化 PAID 14

PAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イディオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。PAID 14をNygene Protein Aアフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただし溶離バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。固分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH 7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。PAID 14(1mg, 水の中で100 μ l)を100 μ lの0.1MのNa₂CO₃、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノ-カブロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20 μ l)をPAID 14溶液に加え、そして22 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8ml/minの流速で、ビオチニル化 PAID 14は18.8minのピークで出現した。このピークを構成する面分をプールし、そして4 $^{\circ}$ Cで保存し、そしてCC49V₁及びV₂CDRにより決定

されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR (Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータープログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEPプレート、pH域3~10(PMC Bioproducts, Rockland, MB)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、 β -ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンチルレクチン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.60である。ゲルを、PMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体種の定量

IgG, scPv2の種および単量体scPvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E_{1%})は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_{1\%} = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys})^2 \text{数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10$$

これらの値は、D. B. Watlauffer, Advances in Protein Chemistry, 17巻, 375~378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scPv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、278nmの吸光度に設定されたUV CORD S II 2238型検出装置および221i型SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCPVUHM); 100ピコモルのプライマー; 1 μ lのPerkin-Elmer-Cetus社(米国, コネチカット州, ノーウォーク所在)のAmpli-Tagポリメラーゼ; 18 μ lの10mM dNTPおよび10 μ lの10 \times 緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている); ならびに合計容積を100 μ lにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94 $^{\circ}$ Cで20~45秒間のDNAの変性; 52~60 $^{\circ}$ Cで0.5~1.5分間のアニーリングおよび72 $^{\circ}$ Cで0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国, カリフォルニア州, ホスター・シティ所在)の380A型もしくは391型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国,

カリフォルニア州, ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20 μ l)は最初18 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、次いで一夜4 $^{\circ}$ Cまで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100 μ lのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピテント細胞(米国, カリフォルニア州, ラ・ホーヤ所在)のStratagene社を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5 μ l)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37 $^{\circ}$ Cで1時間再生させ、続いて、pSCPVUHM, p49LHLHもしくはp49LHHLに用いる20 μ g/mlのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100 μ g/mlアンピシリン(AMPI100)ルリア寒天プレート(LB-AMPI100)上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国, ウィスコンシン州, マディソン所在)のMagicミニ-ブレッププラスミド製造キットを用いて、淘汰圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LHHLと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄で表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV₁とV₂はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHHLを含有する宿主細胞は、 V_L -L- V_H -L- V_L -L- V_L で表すことができるポリペプチドを産生した。ここで V_L と V_H はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリッカーである。

CC49V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H(p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H(p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)のペニシリンナーゼP (penP) ターミナーターの配列を、NheIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCPV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させた後、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター:pSL301(米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCPV UHMの製造手順は、1992年8月21日付出版の米国特許第07/935,895号に記載されている。なおこの出版の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCPV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列: 固有NcoI制限部位; CC49V_L領域; HindIII制限部位; 25個のアミノ酸のリンカー; 固有XhoI制限部位; CC49V_H領域; NheI制限部位; penPターミナーター; およびBamHI制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Mezasら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3μL)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサースバーグ所在)のT7 QuickprimeTM DNA標識キットと、Bulwelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ液によるコロニー溶解法をもとに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-NheI-BamHIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49V_Hに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。NheI-BamHI penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、そのNheIとBamHIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要がある V_L と V_H の領域を繞りて構築するため設計された。各V領域がEco47III-NheI部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V_L 配列は、PCR増幅の標的としてpSCPV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAC-3'

SCP5: 5' -TAAA GCT ACC ACCA AGC GCT TAG TGA GCA GAC GGT CAC TGA GGT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅された V_H DNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈殿および20μL水への溶解によって精製した。その V_H 配列をXhoIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続けている精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4μL)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V_Hインサートを含有していることを示す候補的クローンをNheIおよびXhoI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB)社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ベクター中、XhoI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49V_Hの配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V_H配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HHLTおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12) および CC49V_H(SEQ ID NO: 13)のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -CAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

実施例1 p49LHHLの構築

pSL301HT(5μg)を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49V_H挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCPGCを用いかつ

3'オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP6Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP6B: 5' -TAAA TCC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC GTT CAG TTG CAG CAG TCT-6'

またオリゴSCPGBはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp8~76)を含有している。pSCPV UHM中のCC49V_H標的のアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、PspIとNheIで消化し次いでpSL301HT-Eco47III-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXhoI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSQP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SQP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカー V_L サブユニット(bp1544~1963、図7)は、5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP8aを用いかつPCRの標的としてpSCPV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAAA TCC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTT ATG TCA CAG TCT CC

下線をつけたヌクレオチドは FspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 18) は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC
CAG CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の二組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AfII 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド8~76はリンカーをコードし (図7のヌクレオチド1544~1612)、一方V_hにアニールするヌクレオチド77~99は図7の1613~1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いテール、NheI制限部位、終止コドン、AfII制限部位およびV_hの最後の21個の塩基を含有している。FspIとNheIによる消化の後、この得られた420bpのインサートを精製して精製pSL30HHTベクターのNheIとEco47III部位に連結し、候補的なクローンをNheIとXhoIでスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LPR2(-)とSQP1で配列が決定されて、pSL30IHHT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 19) は下記のとおりである。

49LPR2(-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL30IHHTをXhoIおよびNheIで消化し、精製し、得られた1178bpV_h-リンカー-V_h-リンカー-V_hセグメントをpSCPV UHMに連結してp49LHHLを製造した。なおこのpSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4μ)部分を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM20 奪天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHHLを含有させるために選択した。p49LHHLは、CC49多価一本鎖抗体 scPv2: V_h-L-V_h-L-V_h-L-V_h。またはCC49scPv2 (LHLL)のpenPプロモーターとヌクレオチ

D配列を含有している。

実施例2: p49LHHLの構築

p49LHHLの構築を図11に図式的に示す。リンカーV_hのサブユニットを5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC
AGC ACC AGC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8~78)は図8のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124~1192に相当する)および図6のV_hのヌクレオチド1193~1215に相当する。PCRに対するpSCPV UHM鎖的(ヌクレオチド77~99)にアニールした。

SCP9は、NheI部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)とEco47III部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるためのpSL30IHHTを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18~23は図6のヌクレオチド1532~1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24~48は、PCRにおけるSCP9のアニール領域である図6に示すヌクレオチド1508~1531に相当する。プラスミドpSL30IHHTをEco47IIIとNheIで消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予めFspIとNheIで処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V_h DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3μL)を用いて大腸菌AG1コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しいXhoI-NheIの大きい方のフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴPBNPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 21) は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL30IHHTクローン中にPCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533~1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然にEco47III部位を形成した。図6のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴSCP8Cの末端に5塩基の欠失を組込むことによってpSL30IHHTを製造した。

SCP8C: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGAAGCAGCCGCCAAAAA
GGACGACGCCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGG
AGGTTACAGTTCCAGCAGTCTGAC-3'

SCP8C中の下線をつけた配列はEco47III部位に相当する。PCRにおいて、SCP8Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP10は3'オリゴとして用いられ、リンカー-CC49V_hセグメントが生成する。

SCP10のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 23) は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA
CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1958~1983に見られるNheI部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheIだけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL30IHHT)はEco47III部位(先に形成されている)およびNheI部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μL)を使ってコンピテントイー・コリAG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMPI100プレート上にプレートし次いで候補的クローンをXhoIとNheIでスクリーニングした。正しい大きさ

のDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCDR3(+)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCDR3(+))のDNQ ID NO: 24) は下記のとおりである。

49VLCDR3(+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533~1983からの配列が確認され、正しいpSL30IHHTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミドp49LHHLを製造するために、pSL30IHHT(5μg)をNheIとXhoIで消化し、次いでV_h-L-V_h-L-V_h配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5μg)をXhoIとNheIで消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μL)を使ってコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAM20プレート上にプレートし、次いでp49LHHLに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)およびTAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

実施例3 CC49 scPv2のLHLHとLHHLが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scPv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の園分を、p49LHHLとp49LHHLの両者の1.0Lの一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を250mLづつの4部分に分割し、Sorvall GS-3ロータで10分間5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100mL中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mLの30mMトリス-HCl pH 9で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブに、40w/v%

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞 (hypertonic cell) を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの水に0.5mM MgCl₂中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2μmのNalge社 (米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在) の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社 (米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在) のCentriprp 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容量まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック (shockate) を、Pharmacia社 (米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在) の Superdex 75 HR 10/30 HPLC カラム (予めPBSで平衡化させたもの) に注入した。競合 ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をプールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit (Pierce Chemical社) を用い、緩衝液を3~4回入れながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社の Mono Q HR 5/5 アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合 ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析 (プローブ抗体としてビオチニル化 PAID 14を使用) に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL) の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いで Pharmacia社の Mono S HR 5/5 カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの画分の5と8は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と8はさらに精製するためにプールした。

Mono Qカラムを活性 Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

構築物の等電点 (pI) は DNASTAR社 (米国、ウィスコンシン州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-titrate を使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社 (米国、メーン州、ロックランド所在) の IsoGel IEPプレート pH範囲3~10を使用して測定した。上記 IEPを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V (限定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社の IEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20 および 8.6であった。ゲルは PNCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTAR プログラムによって両方の scFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の6.9の位置にみとめられた。

IgG, scFv2 (LHLHおよびLHHL) のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値E_mは各々、先に引用した Wetlawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvのE_m (280nm)値はそれぞれ1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にPLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition) を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合}-\text{試料競取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合}-100\% \text{競合}} \times 100$$

"ゼロ競合(zero competition)" 値は、1% BSAをビオチニル化 CC49 (3×10⁻¹⁴モル) と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競取り値の平均値を使

用した。最初に試料 (25μL) を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10¹⁰ モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49 (4μg/μl 1:20,000に希釈、25μl使用) で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は IgGには等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Fabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全 IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

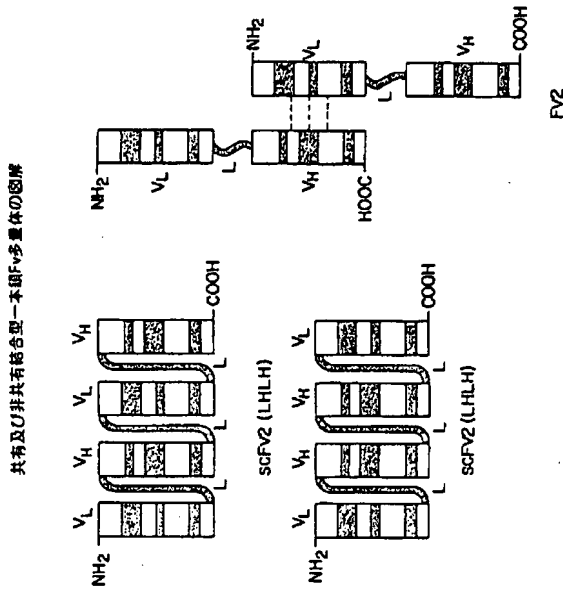
またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの類と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存の IgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

特許(内容に変更なし)

FIGURE 1



共有及び非共有結合型一本鎖F₂多量体の図解

FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
 GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC
 CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC
 CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCF CCT AAA CTG CTG ATT TAC TCG
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG
 AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TOT CAG CAG TAT TAT
 AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG CTG CTG
 AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
 GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
 TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
 CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT
 GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG
 ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC
 AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TOT ACA AGA
 TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
 GTC TCC TCA

FIG. 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu
 Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr
 Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

特許(内容に変更なし)

FIGURE 6

CCGG VL-L-VH-L-L-VH-DNA及びF₂多量体

46 94 142 190 238 286 334 382 430 478
 Cla I EcoR I
 5'-C TCA TGT TGC ACA GGT TAT CAT GGA TGA ATT CCA TCA TCA GTT CCC TCC
 GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA AGG TCA TCA TTT CCT TCC GAA AAA
 ACG GTT GCA TTT AAA TGT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT
 TGT AAG ATT TGA TGT TTG AGT CCG CTG AAA GAT GGT AGG TAC CAA TTA
 TTG TTT CGT CAT TGT TCA ACC GAT AAT GCA GCG ATA GTG GAA
 GTC CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG AGG GAG ACG
 PEPER1- AAC ACT GTA GCG ATA GTG GAA
 PEPER2- TAT AAG TTT CCC TTC CTC TC
 -22 Met Ser Trp Leu Pro Thr Ala Ile Ala Gly Leu Leu
 ATT TTC ATG AAA TAC GTA TTG CCT ACC GCA GCT GGA TTG TTA TTA
 Neo I
 Leu Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro
 CTC GCT GGC CAA CCA GCC ATG GCC GAC ATT GTC TCA CAG TCT CCA
 20
 Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys
 TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG CTT ACT TTG ACC TGC AAG
 30
 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
 TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GGC

FIG. 6D

240
 VHS91- G AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA G
 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Pyl Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA 1102
 250
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAG GAC GCA GCT 1150
 260
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Ala
 AAA AAA GAC GAT GCC ALA AAG GAT GAC GCC AAG ALA GAT CTT GAC ATT 1198
 270
 Val Met Ser Gln Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Val Gly Gln Lys
 GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GCG GAG AAG 1246
 280
 Val Thr Leu Ser Cys Ser Lys Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser Gly Asp
 GTT ACT TTG ACC TGC MAG TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT AAT 1294
 290
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG MA CCA CCA GGG CAG TCT CCT 1342

FIG. 6B

50
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA CCG CAG TCT CCT AAA CTA CTG CTG ATT TAC TGG 526
 60
 Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT GAT CCG TTC ACA GGC AGT GGA 574
 70
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp
 TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC 622
 80
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
 CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCG CTC ACC TTC 670
 90
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys
 CCT GCT GCG ACC AAG CAG CTG GTG CAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG ALA 718
 100
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
 AAG GAT GCT CCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA GAC GAT GCT AAA AAG 766

FIG. 6E

330
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Val Pro Asp
 AAA CTG CTG ATT TAC TGG CCA TCC GCT AGC GAA TCT GGG GTC CCT GAT 1390
 340
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser
 CCG TTC ACA GGC AGT GGA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC 1438
 350
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 AGT CTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT 1486
 360
 ACC TAT CCG CTC ACC TTC GGT GGT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAG GTA 1534
 370
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 AGT CTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT 1582
 380
 ACC TAT CCG CTC ACC TTC GGT GGT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAG GTA 1630
 390
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu
 ACC TAT CCG CTC ACC TTC GGT GGT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAG GTA 1678
 400
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 AGT CTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT 1726
 410
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu
 ACC TAT CCG CTC ACC TTC GGT GGT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAG GTA 1774
 420
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 AGT CTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT 1822
 430
 Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
 GCT GAG TTG GTG AAA CCT GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT 1870

FIG. 6C

140
 Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro
 GAC CTC GAG GTT CAG TGG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT 814
 150
 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 GCG GCT TCA CTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GCG TAC ACC TTC ACT 862
 160
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Gln
 GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA 910
 170
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln
 TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 958
 180
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr
 AGC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC ACC ACT 1006
 190
 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr
 GCG TAC GTG CAG CTC AAC ACC CTG ACA TCT GAG CAT TCT GCA GTG TAT 1054
 200
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln
 TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 958
 210
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr
 AGC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC ACC ACT 1006
 220
 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr
 GCG TAC GTG CAG CTC AAC ACC CTG ACA TCT GAG CAT TCT GCA GTG TAT 1054

FIG. 7C

Xho I 140 150
 Asp Leu Glu Val Gln Leu Gln Ser Asp Ala Glu Val Lys Pro
 GAC CTC GAG GTT CAG TTG CAG TCT GAC GCT TTG GTG AAA CCT 814

 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT 862

 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Glu
 GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA 910

 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Gln
 TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 958

 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr
 AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC ACC ACT 1006

 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr
 GCC TAC GTG CAG CTC AAC ACC CTC ACA TCT GAG GAT TCT DCA GTG TAT 1054

 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA 1102

FIG. 7E

Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 TCC CTC AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA CTC ACC GTC TCC 1534

 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp
 TCA CTA ACC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582

 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln
 GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAG 1630

 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser
 TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG ACC 1678

 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
 TCC AAG TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAG TAC
 49LFR2(-)-G 1726

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 AAC CCG ACC ATG GTC GTC 460 1774

 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACC AGT GTC AAG ACT 1870

 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu
 GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG 510 1918

 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys *** Phe I
 ACC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTT AAG TAA AAA GCT ACC GAT 1966

 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014
 S9P1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT
 PENTSEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT

 CAT ATC ATT GTC CCG CAA TUG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TGT ATC TTT 2062

 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAG CCG AAA ATC GGT CTG CCG GAA AAG ACC 2110

 GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT GCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158

 BamHI
 CCG ATC C-3' 2165

FIG. 7D

Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA ACG GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT 1150

 Lys Lys Asp Asp Ala 270 Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln
 AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198

 Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
 CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAC TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG 1296

 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile
 AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC GAT CCA ATT 1294

 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gln Gln Gln Trp Ile Gly Tyr
 CAC TGT GTG AAA CAG AAC CCA CCA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT 1382

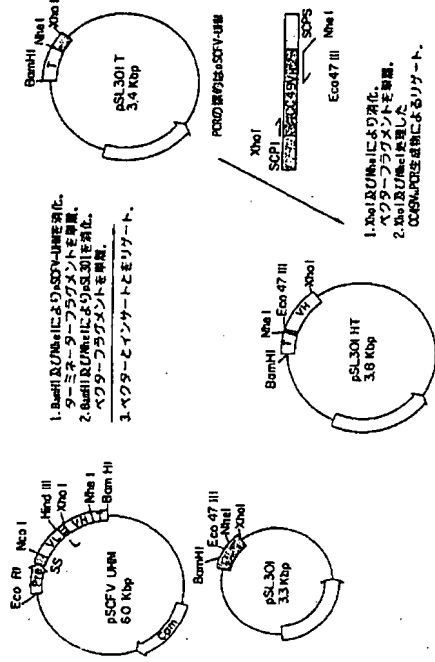
 Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asp Gln Arg Phe Lys Gly
 TTT TCT CCC GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG ACG TTC AAG GGC 1390

 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ala Tyr Val Gln
 AAG GCC ACA CTG ACT DCA GAC AAA TCC TCC ACC ACT GCC TAC GTG CAG 1438

 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Gln Gln Tyr Phe Cys Thr Arg
 CTC AAC ACC CTC ACA TCT GAG GAT TCT DCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA 1486

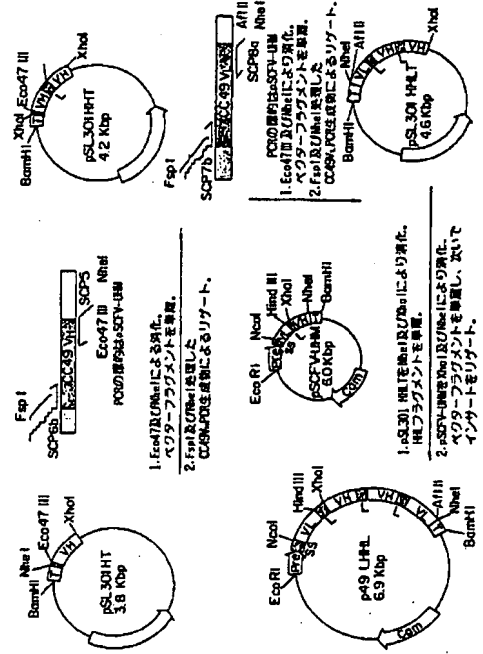
特許(内容に変更なし)

FIGURE 8



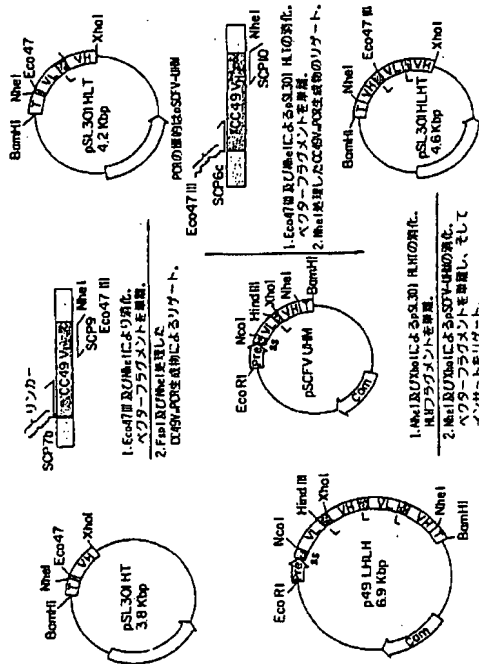
特許(内容に変更なし)

FIGURE 9



特許(内容に変更なし)

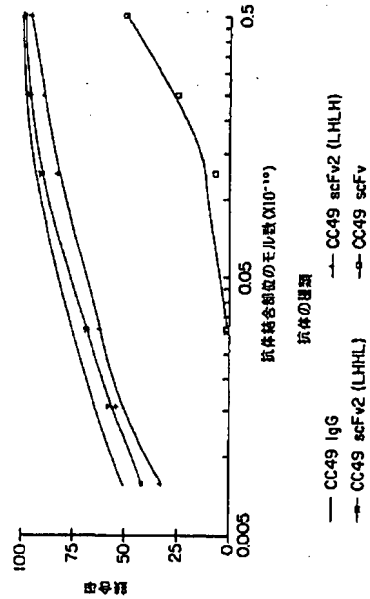
FIGURE 10



特許(内容に変更なし)

FIGURE 11

CC49 IgG, SCFv2 & SCFv2の融合アッセイ
融合因子: ビオチニル化CC49 IgG



手続補正書(方式)

平成6年9月1日

特許庁長官 高島 章 殿

1. 事件の表示

PCT/US93/12039

2. 発明の名称

多価の一本鎖抗体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザク ケミカル カンパニー

4. 代理人

住所 千105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル

貴和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 弁護士(7751) 石田 敬



5. 補正命令の日付

自発補正

6. 補正の対象

- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
 - (2) 図面の翻訳文
 - (3) 委任状
7. 補正の内容
- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書(内容に変更なし)
 - (2) 図面の翻訳文の浄書(内容に変更なし)
 - (3) 別紙の送り



国際調査報告

PCT/US 93/12039 IPC 5 C12N15/13 C07K31/20 C12N15/62 A61K39/395	
A. PRIORITY CLAIMS IPC 5 C12N C07K	
B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category 1 X WO.A.91 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1 Y Y CANCER RESEARCH vol. 82, no. 12, 15 June 1992, PHILADELPHIA, PA, USA pages 3402 - 3408 T.YOKATA ET AL. 'Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms' see page 3403, column 1, paragraph 4	Abstract to class No. 1, 5 2-4, 6 1, 6
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (continued)	
26 March 1994 27 -04- 1994 Cupido, N	

国際調査報告

PCT/US 93/12039	
Category 1 Y BIOCHEMISTRY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA US pages 10117 - 10125 N.V.PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2	Abstract to class No. 2, 4
X EP.A.0 506 124 (TANOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4	1, 5
P,X WO.A.93 11161 (ENZON, INC.) 10 June 1993 see figure 19A	1, 5-6

国際調査報告

PCT/US 93/12039		
WO-A-9119739 26-12-91	AU-A- 7843191 EP-A- 0486682 GB-A- 2250959 JP-T- 052039	07-01-92 27-05-92 24-08-92 18-04-93
EP-A-0506124 30-09-92	AU-B- 640563 AU-A- 1299282 JP-A- 6117164	08-09-93 16-10-92 14-05-93
WO-A-9311161 10-06-93	AU-A- 3178993	28-05-93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. °	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 18/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//(C12P 21/08

C12R 1:19)

【F1】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

平成9年 7月 2日

特許庁長官 茂 井 秀 光 殿

1. 事件の表示

平成6年特許第514437号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 サ ダ ウ ケミカル カンパニー

3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1900

氏名 弁護士(7751) 石 井 敬



4. 補正対象書類名

明細書及び請求の範囲

5. 補正対象項目名

明細書及び請求の範囲

6. 補正の内容

- (1) 明細書を別紙の通り補正します。
(2) 請求の範囲を別紙の通り補正します。



7. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 通
(2) 請求の範囲 1 通

明 細 書

多価の一本鎖抗体

本発明は、本類の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により生成されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は4鎖体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと二本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は二本の可変性ドメインと、二本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは増やなエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データベースは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保守されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示す。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の特異性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは5つの同一の結合部位を有している。

同一の遺伝子系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は特許及び治療目的の両方として重要とされている。モノクローナル抗体は、単立された下眼に錠剤、マウスのリンパ球と適当なマウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより巨量的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインゼンが治療及び診断にとってのメス1抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体反応に基づき制約されている。

モノクローナル抗体であって、一の鎖に由来する抗体の場合又は可変領域が別の鎖に由

聚する抗体の定常領域と組合されたものが従来の方法論により作られている。
例えば、Sahagosaら、Immunol., 137: 1086-1074 (1990); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1985); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 9439-9443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。
典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その動態力学に影響を及ぼすタンパク質糖鎖全体のうちの主要部分を構成するFc領域を含有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、腫瘍組織に迅速に集中し、且つ結合する抗原分子を得ること、及び未結合の抗体が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さな抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く削除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV_Hと一本のV_Lとにより一本鎖抗体フラグメント(scFv)が作られており、これは8つのC_H2を含む、もれはペプチドリンカー (本発明特許 4,916,778号) により連結されたV_H-L₁-V_L ポリペプチドを成しており、ここでLはペプチドリンカーを表している。V_HとV_Lドメインが互向V_H-L₁-V_LであるscFvが米国特許第 5,32,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べては、Fcは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて高い活性を有している。

従って、このポリペプチドの所性を高めるため、凡そその抗原結合特性を保持又は高めるため、増強の結合部位を有するFcの構築を導くことが有利であろう。加えて、機能的な上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター構築の抗体ベース構築を可能とする、又は亦あるいは診断成分の抗体構築を可能とする二価特異的である多価scFvを維持することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のV_Hと一本のV_L

ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。懸液において、本発明は抗体に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2以上の可変ドメインと2本以上の非可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の懸液において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗体に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

- (a) 可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
(b) 可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。

別の懸液において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提示し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

- (a) 可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
(b) 可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図中の用語の定義

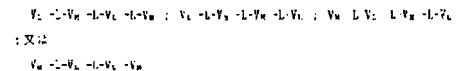
図1は、V_H-L₁-V_H-L₁-V_L-L₁-V_L (L1L1) と V_H-L₁-V_H-L₁-V_L-L₁-V_L (L1L1L1) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型V_H-一本鎖抗体 (Fc2) を示す

- 図2は CC49V_H (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。
図3は CC49V_L (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。
図4は CC49V_H (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。
図5は CC49V_L (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。
図6は p49LBLE (SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本鎖抗体L1L1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。
図7は p49LBLE (SEQ ID NO: 8) におけるCC49一本鎖抗体L1L1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。
図8はプラスミド pSL3017及びpSL3018Tの構築を示す。
図9はプラスミド p49LBLEの構築を示す。
図10はプラスミド p49LBLEの構築を示す。
図11はCC49Fc₂、CC49Fc₂及びCC49Fc₂を用いた、融合因子としてデオキシリボ化 (D49Fc₂)を用いる融合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の表示全体を引用することで本明細書に引入れる。
概説、アミノ酸、ペプチド、糖鎖、遺伝子等を略すとき、それらはBIOCHEMISTRY (Commission on Biochemical Nomenclature) 又は関連分野の裏面に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、V_HとV_Lにより取わられる、ペプチドリンカー(L)によりV_Hドメインに連結されたV_Lドメインを含むポリペプチドを意味する。V_HとV_Lドメインとの順序は任意であってよく、V_H-L₁-V_Lとして表わされるポリペプチドが獲得であろう。「ドメイン」は、技術の領域、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。
「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗

体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、



のV_HとV_Lドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。
三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な懸液においては、V_HとV_Lドメインの数は等しい。

本発明は、
V_H-L₁-V_H-L₁-V_L-L₁-V_L 又は V_H-L₁-V_H-L₁-V_L-L₁-V_L
で表示される多価の一本鎖抗体を提供する。

V_H-L₁-V_H-L₁-V_L-L₁-V_L (L1L1L1) 及び V_H-L₁-V_H-L₁-V_L-L₁-V_L (L1L1) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型V_H-一本鎖抗体 (Fc2) も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の遺伝子及び/又は可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その可変ドメインは同一の抗原に特異的である。選択されて多価の一本鎖抗体を構築している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の発現が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングの経路として、逆転写酵素併用合成によりcDNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの区画は塩基配列にわたるハイブリドマから獲得できうる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Cu

...ura Collection, 20290 Parklawn Drive, Rockville, Md., USA (1090) を参照のこと、その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を公認するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用される。これらの抗体系及びその他の類似の種族が、可変ドメインをコードするcDNAの配列として、ヌクレオチド配列の抗体の遺伝子配列を決定するために反復タンパク質を産出するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な寄贈動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られる。その免疫原は標的の抗原であるか、又はハプテンであるか、キーホルリンペットヘンシアン(KLH) の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性抗体である。免疫は宿主細胞動物への通常は2〜3週間隔きの免疫原の1又は複数の繰り返し注射によって序々に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当量液に公知の標準手順により簡単に産出できるようにハイブリドーマを誘導するための恒常細胞に利用する細胞懸液へと溶解する。

標的の抗体が産出でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_H及びV_Lドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開された PCT出願 WO 86/04410 及び1989年1月26日に公開された PCT出願 WO 89/00592 に開示されている。免疫調整タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT出願 WO 90/04410 及び WO 89/00592 においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_H及びV_Lドメインである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SBQ ID NO : 1) は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lのアミノ酸配列(SBQ ID NO : 2) は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SBQ ID NO : 3) は図4に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lをコードするアミノ酸配列(SBQ ID NO : 4) は図5に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の本発明抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V_HとV_Lドメインを連結するための適

当なリンカーは、V_HとV_Lドメインが、一本鎖ペプチドであって完全抗体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを産出するための適当なリンカーは、キムノグロブリンフラグメントのV_H及びV_Lドメインが二次元構造であって、その各フラグメントが、そのキムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なるものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に記入される本開示特許 4,566,772号に開示の方法により獲得できよう。この第4,946,776号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が得られよう。

好ましくは、V_HとV_Lドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の本発明抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その遺伝子の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように追加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantelianoらのBloxam, 26, 6117-10126(1991) に開示されている2500と称されているヘリカルリンカーを基盤とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にある[30] 部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に置かれている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SBQ ID NO : 5) は下記の通りである：

Leu Ser Ala-Asp-Asp-Ala-Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp-Asp-Ala-Lys Lys Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

このリンカーは一般に10〜30のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが

含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性を有するレプリコンとコントロール配列を含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中で表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保持している。例えば、大腸菌 (*E. coli*) はpBR322を用いて容易に形質転換される (McLivarら, Genes, 2, 95-(1977)又はSambrookら, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版 (1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. cerevisiae (*S. cerevisiae*) 又は一部のパン酵母が真核微生物の中で最も一般的に利用されているが、数多くのその他の種、例えばピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) が有用である。多価抗体、例えばATCCより入手できる 3F7/9) 又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドは pSV2neo及び pSV2gpt(ATCC) ; pSV1及びpSV2neo (Pharmacia), pMPV-1 ; pMT24 (Conceptual Biotechnology, Inc.) である。

不発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための標的及び高価ウイルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入経路において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前記に記載の方法によりゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築物は、機能的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ペプチドの合成/翻訳の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その免疫原性、不溶性物質としてそのポリペプチドが容易に溶解することを避けるために輸送、折りたたみ及び無垢状態とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ペプチドの製造に合致して適当な要素が必要とされる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその

生成物が凝縮及び折りたたみを助長するために必要とされる (シナペリン)。前記されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たすように簡単に複製される。かかる複製は入手できる動物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選択できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、結果 104技術を用いて構築されたベクターにより細胞的に形質転換される細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、発現微生物が培養槽の中で繁殖することを防ぐうえで利用される。この態様において、かかる細胞形質転換細胞の培養物は存在のために誘発された発現を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業者に公知の標準技術を利用して達成される。例えば、もしそれが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は膜外濾過により濃縮される。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラスマ空間へと輸送されるなら、回収はその細胞に浸透性ショックを与え、次いで膜外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成される。不溶性であり、且つ還原体 (refractile bodies)、選別対人知として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、対入体を溶解するための滅菌と洗浄の繰り返し、例えばグリニオン-101による可溶性化、及び高濃度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって得られるであろう。

一本鎖の多価抗体の特性は当業者に公知の標準アッセイ、例えば結合アッセイ、酵素結合免疫吸光アッセイ(ELISA) 及びラジオイムノアッセイ(RIA) により決定できよう。

本発明の多価の本発明抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の本発明抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的細胞により迅速に阻害し、そ

して多体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多量の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが抗原に結合して得られるように、及び/又は複製の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように誘導される。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な時に肝臓内な薬型組成物も考慮しており、ここでこの薬型抗体はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多量の一本鎖抗体は適当なイメーリ又は治療時に当適用に公知の方法によって結合される。本発明の薬型組成物は当業界に公知の方法、例えば電泳の混合、透析又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その異なる例示を参照する下記の表の考案により更に明かにする。

表 1

BC1P	5-ブロモ-1-クロロ-3-インドールホスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	(1, 3-ビス [トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ] プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CBR	細胞融解液
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
7y2	非共有一本鎖抗体ダイマー
IBF	中和点電気泳動
Ibp	中和点対
LD	Luria Bertani: 培養
Mab	モノクローナル抗体
MFS	2-(N-メルカリノ) エタンスルホン酸
MP	分子軌
YDT	ニトロアルキルトリブチルクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド

PAE	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PES	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFVをコードする DNA配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノアッセイ
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖抗体イムノグロブリンフラグメントモノマー
scFva	共有結合した一本鎖抗体イムノグロブリンフラグメントダイマー
SBS	ドデシル硫酸ナトリウム
TDS	トリス塩基緩衝水
トリス	(トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)
TBS	ブイーン20洗淨液
V _A	イムノグロブリン鎖鎖可変ドメイン
V _L	イムノグロブリン鎖鎖可変ドメイン

抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として商標。

CC49Fab: 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗凝集抗体。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC497y2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv, 7yの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば: CC497y2は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V_Lドメインと2本のV_Hドメインより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_L(L)とV_L(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHHL, LLHL, HLLH, HLHL及びHLLL。

プラスミド

pSCFV-UM: 22のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変重鎖とCC49可変軽鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

pELISA又はpRIL: CC49scFv2 LELIS又はLHLIS生成物のそれぞれを産生するためのコード配列を含むプラスミド。

実験例

二重抗体

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組み入れる。 Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 2版 (1989) 及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て超イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び処理

オリゴヌクレオチド (オリゴ) は全て、標準のオンシアノエチルホスホラミド及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 381 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、蒸水酸化アンモニウムの中で55°Cで6-15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその乾燥混合物を33-40µlの蒸留水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の際、オリゴを塩液 (IBF) 光を用いて可視化した。RNAバンドをゲルから切り出し、そして1.0Mのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのDTAの中で65°Cで2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac (商標) C-18カラム (Waters, Bedford, MA) に適用し、そして結合したオリゴを80%のメタノールで溶出させることにより行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてUV吸光度を290nm (OD₂₉₀) での光学密度を測定することにより決定した。

抗原免疫反応性

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD),

New England Biolabs, Inc. (Everett, MA) 又はBoehringer Mannheim (Mannheim, Germany) の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の提供する手順に従って実施した。用いた試薬をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分離させた。そのゲルをニトリウムブロミドで染色し、その DNAバンドを紫外光により可視化させ、次いでその DNAバンドを切り出した。そのゲルを5.0Mのトリス、2.5mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Bio-Lab Cartridge Corp., Chicsco) の中に入れた、そしてMax Sorbmarin電気泳動装置 (Boehr Scientific Instruments, CA) を用いて蒸留させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器 (Savant Instruments, Inc., NY) で下げた。DNAをエタノール法で沈ませ、そして蒸留水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857 (1986) に実質的に記載の通りに調整した TAG-72抗原を、ポリビニルクロリド38穴マイクロタイティングプレート (Ornatech Laboratories, Inc., Chastilly, VA) のウェルの上に一夜乾燥させたことで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31°Cで1時間ブロックし、次いで200µlのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25µlの凝集抗体及び25µlのビオチニル化CC49 (1/20, 000倍希釈の10µg/mlの溶液) をウェルに加え、そしてそのプレートを31°Cで30分インキュベートした。プレートに結合した TAG-72, ビオチニル化CC49, ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色物質は、余剰な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5µg/mlのCC49及び10µg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は溶LISとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50µl (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) を加え、そしてそのプレートを31°Cで30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50µlのペラーニトロフェニルホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー (Mu

tecular Devices Corporation, Natick Park, CA)を用い401-430 nmでの光吸収スペクトルにより測定した。scFv2の場合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SPS-FACE及びウェスタンブロットニング

SPS-FACE分析のためのサンプル (20 μl) を、非還元型サンプル変換バッファ (Integrated Separation Systems (ISS), Natick, MA) の中で3分間煮沸することにより調製し、そして0.0-20%割合のポリアクリルアミド Beitec Bi-Mixgelにその製造者の仕様書 (ISS) に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置 (ISS) を用い、ゲル面が55mAで、一定の電流で約75分行った。ゲルをクマジーブリアントブルー-R 250 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準は予め定められており (Mid Range kit, Diversified Bio-tech, Newton Center, MA)。そして下記のタンパク質を含んでいる: ホスホリラーゼβ、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバロアミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、ヨウ素アトログロブリン及びホモシロームC。対応の分子量はそれぞれ85,000、55,000、43,000、38,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デブリアゲートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を過塩素酸で1.0、1Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15-20分平衡にした。Immobilin P PVDF (ポリビニリデンジクロロイ) 膜 (Millipore, Bedford, MA) をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ (100 mM Tris, pH 8.0) の中で3分平衡にした。Millipore-SDE 装置 (Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一滴の陽極バッファを1名陽極電極の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを陽極バッファ #1 の中に浸し、そしてその電極面上に均等に置いた。陽極バッファ #2 (25 mM Tris, pH 10.4) の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に置き、そして最後に陽極バッファ #1 (40 mM のグリシン中の25 mM のトリス HCl, pH 8.0) の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250 mA の定電流 (初期電圧は8-20ボルトに調節した) を用いて30分で進められた。

ブロットした後、その膜を水の中で標準にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液 (トリス緩衝食塩水 (TBS) 中の1%の牛血清アルブミン (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) を含有するもの) に入れた。TBS は Pierce Chemical (Rockford, IL) より、チロシン希釈水として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は250μMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を最少限1時間、室温でブロットし、そして20mlづつ 0.5%のツイーン20洗浄液 (TT 18) を用いて5分間3回洗った。TTBPを固定するには、0.5mlのツイーン20 (Sigma) を TBSのリッター当たり混合した。使用したブローブ抗体は200mlのビオチニル化 F4D 14溶液とした (10 μg / 200 mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTBSに1gのBSAを加えることにより作った。室温で30-60分ブロットした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温において30-60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの適合されたストレプトアビジン (StreptA Bio technology Associates, Birmingham, AL) 20ml とインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ (20ml) の中で2分洗った。このバッファは 0.1Mの炭酸ナトリウム、1 mMの NaCl・H₂O, pH 8.0とした。アルカリホスファターゼにとっての基質を作るため、ニトロブルー-テトラゾリウム (NBT) クロリド (50mg, Sigma) を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドールホスフェート (BCIP) (25mg, Sigma) を別に 100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドールホスフェート (BCIP) (25 mg, Sigma) を別に 100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ 150 μl を上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色液からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化, PAGE, IEF

FA11 (44k, CC49) に対して特異的な、ATCC No. CRL10226として提供されているネズミの抗-イデオタイプ抗体 (162a, Xアンソグロブ) である。FA11 (4kを Xygene Protein A アフィニティカラム (Pharmacia, NY) を用いて精製した。製

造者のプロトコルに従ったが、ただし希薄バッファとして 0.1Mのクエン酸ナトリウム, pH 3.0を用いた。固分を 1.0Mのトリス-HCl, pH 9.0を用いてpH 7に中和した。ビオチニル化反応は上記の通りに設定した。FA11 (1 μg, 水の中で 100 μl) を 100 μl の 0.1MのNa₂CO₃, pH 9.8と混合した。ビオチニル化反応は、ビオチニル化 N-ヒドロキシスクシニミドエステル (Biotin-X-NHS) (Calbiochem, La Jolla, CA) (2.5mg) を 0.5mlのジメチルホルムアミドの中に溶かした。Biotin-X-NHS 溶液 (20 μl) を FA11 溶液に加え、そして22°Cで1時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム (Pharmacia, NJ) を用いてゲル濾過により除去した。0.8 μl / min の流速で、ビオチニル化 FA11 (4k) は 16.8minのピークで出現した。このピークを構成する成分をブールし、そして4°Cで凍結し、そして CC49V₂ 及び V₁ CDR により洗浄されるCC49イデオタイプを抽出するに用いた。

等電点電気泳動 (IEF)

等電点 (pI) は、DBAS-CAR (Madison, WI) を介して入手できる PROTEIN-TITRA 17という名のコンピュータープログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えて網目が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、IscoGelアガロース IEFプレート、pH範囲3-10 (Bio-Lab Products, Rockland, ME) を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト (固分)、2mAの電流及び10Wの定電電力とした。電気泳動時間は 90minで完了した。IEF標準品はBioradより購入した。そのネットはフィコシアニン、β-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3種レクチン及びヒトホモシロームCを含み、それらのpI値は4.85、5.10、6.00、6.80、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00並びに8.20及び9.50である。ゲルを、PVCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体種の定数

16k, scFv2の種および単量体 (Fab) を含む複製CC49抗体はすべて、含有している1.0cm長路長の石英製キャベット (Helina社) および Perkin-Elmer UV/VIS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の 280nm波長の吸光度を測定して定量化した。モル吸光係数 (E_{1%}^{1cm}) は、各抗体について、下記式を用いて算定した。

$$E_{1\%} = (Cys残基) \times 3,500 + (Tyr残基) \times 1,340 - (Cys) \times 2) \times 150 - (Phe残基) \times 10$$

これらの値は、W. K. Wallacer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375-378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いた IEF HPLC システムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2122型検出器、270nmの吸光度に設定された UV CORE 8 H 2238 型検出装置および2211型 Esco/Rac fraction collectorで構成されている。

サブユニットの PEGによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) はすべて、150bpプログラム (pg) のプラスミド標的 (p8CFV2) 103ピコモルのプライマー: 1 μlのPerkin-Elmer-Cetus社 (米国) コネティカット州、ノーウォーク所定の PCC社 の Ampli-Tagポリメラーゼ; 16 μLの 10 mM dNTPおよび10 μLの10×緩衝液 (向きともに PCC社) に提供されている; ならびに合計容積を 100 μLにするのに充分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はマーカが記述しているのと同様にして行った。これらの反応は、PCR 8600熱サーモサイクラー (thermocycler) を用いて20サイクルを行ったが、その1サイクルは、94°Cで20-45秒間の DNAの溶融; 52-60°Cで 0.5-1.5分間のアニーリングおよび72°Cで 0.5-2.0分間の伸張で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社 (米国, カリフォルニア州, フォスターシティ) 所定の330A型もしくは 581 8A 反応器で合成し、次いで上記のようにして精製した。

リジェンション

した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SCP7b: 5'-TAA TCC GCA GAT GCG GCA AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCG AAA AAG GAT GAC GCG AAA GAT GTT GAC ATT CTC ATG TCA CAG TTT
CC

下線をつけたヌクレオチドは PstI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP8a: 5'-TAAA GGT AGC TTT TTA CTT AAG CAG
CAG CTT GGT GGC-3'

下線をつけた最初の 2 個は XhoI 部位に相当し、もう一つの XhoI 部位に相当する。SCP7bのヌクレオチド 3-70 はリンカーをコードし(図 7 のヌクレオチド 1546-1612)、一方 V_H にアニールするヌクレオチド 77-93 は図 7 の 1612-1635 に相当する。プライマー SCP8a は、その 3' 末端の近かいチール、XhoI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位および V_H の最後の 2 個の塩基を含有している。FspI と XhoI による消化の後、この得られた (2bp) のインサートを複製して精製 pSL301HLT ベクターの XhoI と Eco47III 部位に連結し、継続的なクローンを XhoI と IhoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認された 461P32 (-) と SP101 で配列が決定されて、pSL301HLT 中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

461P32 (-): 5'-CTG CTO GTA CCA GCG CAA G-3'

プラスミド pSL301HLT を XhoI および XhoI で消化し、精製し、得られた 1176 bp V_H、リンカー-V_H、リンカー-V_H、セグメントを pSCPV LHM に連結して p49LHL を構築した。なおこの pSCPV LHM は同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応混合物(4 μl 部分)を用いてコンピテント大腸菌 AG1 細胞(Stratagene社)を形質転換し、LCA 200 変大プレートにプレートした。正しい制限酵素型を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHL を含有させるために選択した。p49LHL は、GC49 多価一本鎖抗体 scFv2: V_H-1-V_H-1-V_H-1-V_H または DC49scFv2 (LHHL) の pepB プロモーターとヌクレオチド配列を含有している。

りは次のステップで修正され、オリゴSCPC (SEQ ID NO: 21) の末端に 5 塩基の欠失を補正することによって pSL301HLT を製造した。

SCP6C: 5'-TAAGGCTGATGATGCTAAGAAGGACCCCGAATAA
CGACACCGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGATCTCC
AGCTTCAATTCAGGAGCTGAC-3'

SCP6C 中の下線をつけた配列は Eco47III 部位に相当する。PCR において、SCP6C は 5' オリゴとして用いられ一方 SCP1012 3' オリゴとして用いられて、リンカー-CCc99、セグメントが生成する。SCP10 のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22)は「E」のとおりである。

SCP10: 5'-TCT TTD TAG CTT TTT ATG AGG AGA GCG TGA
CTG AGG TT 3'

SCP10 中の下線をつけた配列は図 6 のヌクレオチド 1538-1588 に見られる XhoI 部位に相当する。この場合、PCR インサートは XhoI だけで消化されたい複製される。ベクター(pSL301HLT)は Eco47III 部位(先に形成されている)および XhoI 部位で消化されたい複製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μl)を使ってコンピテント E. coli AG1 細胞を形質転換した。この形質転換混合物を LB-AMP100 プレート上にプレートし次に候補のクローンを IhoI と XhoI でスクリーニングした。正しい大きさの DNA を有する 3 個のクローンを得た。これらのクローンのうちの 2 個は、オリゴ 49LCOB3 (-) および SP101 を用いて配列が決定した。そのヌクレオチド配列(49LCOB3 (-) の SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

49LCOB3 (-): 5' CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図 8 のヌクレオチド 1533-1662 からの配列が確認され、正しい pSL301HLT クローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHL を製造するために、pSL301HLT (5 μg) を XhoI と IhoI で消化し、次いで V_H-1-V_H-1-V_H 配列を含有する小さい方のインサートを複製した。この断片を、pSCPV ULM (5 μg) を IhoI と XhoI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの複製物と連結した。上記連結混合物の一部(4 μl)を使ってコンピテント大腸菌 AG1

実施例 2: p49LHL の構築

p49LHL の構築を図 10 に模式的に示す。リンカー-V_H のサブユニットをオリゴの SCP7b と 3' オリゴの SCP9 で置き換えた。

SCP9: 5'-TAA AGC TAG CAC CAA GCG GTT AGT TTC
ACC ACC AGC TTC GTC CCA G-3'

SCP7b オリゴ(ヌクレオチド 3-70)は図 6 のリンカーをコードし(ヌクレオチド 1124-1192 に相当する)および図 6 の V_H のフラグメント(1193-1215)に相当する。PCR に対する pSCPV LHM 断片(ヌクレオチド 77-93)にアニールした。

SCP9 は、XhoI 2 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次の V 領域を受けるための pSL301HLT を作るのに必要な制限部位である。SCP9 のヌクレオチド 118-23 は図 6 のヌクレオチド 1532-1557 (リンカーの最初の 2 個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド 21-161 は、PCR における SCP6 (SEQ ID NO: 19) のアニールリング領域である図 8 に示すヌクレオチド 1508-1531 に相当する。プラスミド pSL301HLT を Eco47III と XhoI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、FspI と XhoI で処理され精製された。PCR からのリンカー-CC49V、DNA インサートと連結させる。その連結混合物(3 μl)を用いて大腸菌 AG1 コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい IhoI-XhoI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PEF1/STQ2 を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 20)は下記のとおりである。

5' TTG ATC ACC AAG TCA CTT TAC G-3'

配列決定の結果は、得られた pSL301HLT クローン中に PCR の誤りや欠失があるということを示した。図 8 にみられるヌクレオチド 1533-1537 に相当する 5 塩基の塩基の欠失がみとめられ、そして T であるべきはずのヌクレオチド 1531 は ATG 塩基のデレタから修正したところ実際には G であった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT ... であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47III 部位を形成した。図 6 の AGCCCT の配列はヌクレオチド 1530、1531、1532、1538、1539 および 1540 に相当する。この 3 個

細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物を LB-CAN20 プレート上にプレートし、次いで p49LHL に対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図 10 参照)および TAT 72c に対する動物活性に基づいて選別した。

実施例 3: C49 scFv2 の p49LHL と p49LHL の共有結合した 2 量体の構築

CC49 の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の構築を行うために、大腸菌のペリプラスム膜断片の成分を、p49LHL と p49LHL の両方の 1.2L の大腸菌細胞から調製した。長約すると、培養物を 250ml づつの 4 部分に分割し、Sorvall GS-3 ロータで 10 分間 5300rpm で遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaCl を含有する 10mM トリス-HCl pH 7.3 からなる 100ml 中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100ml の 30mM トリス-HCl pH 3.3 で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブに、10W/V のスクロースを含有する 30mM トリス-HCl pH 7.3 (100ml) および 10mM EDTA pH 7.5 (2.5ml) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に 10 分間保持した。高酸性細胞(Lyso-perionic cell)を精製するようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを 20ml の氷冷 0.5M NaCl 中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に 10 分間保持した。その細胞を消化するようにしてペレット化し、大腸菌の両辺細胞質の成分を含有する上澄み液を、0.2 μm の Nalco 社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の透過膜で濾過することによってさらに清澄にし、次いで Amicon 社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)の Centrifuge 30 および Centricor 30 で 1.0ml より小さい容量まで濃縮した。

p49LHL3 または p49LHL のクローン由来の両辺細胞質のシャケット (shot kete) を、Pharmacia 社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)の Superdex T5 HR 10/30 HPLC カラム(予め P36 で平衡化させたもの)に注入した。親合 ELISA で測定する場合、問題の生成物は 0.5ml/分の流量で 21-24 分間流出した。活性成分をプールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム 500 Microdialyzer Unit (Pierce Chemical 社)を用い、緩衝液を 3-4 回交換しながら 8000MW カットオフ膜を使用して、20mM トリス-HCl pH 7.6 にして一度透析を行った。その試料を Pharmacia 社の Hozz 2 Hx 5/5 アニオン交換 HPLC カラムに注射した。緩衝液として 20mM トリス-HCl pH 7.6 を用い、濃縮液 D とし

て20Mトリス-HCl pH 7.6に0.5M NaCl を含む勾配プログラムを、1.5ml/min の流量で使用した。同様の生成物は、競合 ELISA法で測定する場合、各々3〜4分間カラムから放出された。この時点の両分の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクローミングリアントブルー3250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析(ブローブ抗体としてジオチニル化 PAID 14を使用)に移されたが、scFv2(LHL)またはLHLの種の誘導分子量の単一バンドが、SE 239ダルトンの位置に出現した。活性種分は場合差あり、50mM NaS pH 8.8に対して一度透析し、次いで Pharmacia社のHoe S ER 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの両側の二つの百分の五は、GEL TAG 法および ELISA法で測定する場合、免疫反応が開始される直前に放出された。したがってこれらの百分は実際にはカラムに結合していたわけである。次いで百分五と五はさらに精製するためにブールした。

Hoe Qカラムを活性種分 S 成分について再度使用したが使用した緩衝液は20mM トリス-HCl pH 8.0であり、流量は 0.8ml/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Hoe Sに挟んでいる不純物がわずかにあり、したがって分離は5〜6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蓄した。

等電点電気泳動

精製物の等電点 (pI) は DEXSTAR社 (米国、ウンスコンシ州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-electricを使用し、予備した、アミノ酸組成、およびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社 (米国、メーン州、ロックランド所在) のImmel 1EPアンチpIゲル(商品名 3-10)を使用して測定した。上記 1EPを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mA で500V (既定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は30分間で完了した。Biorad社の 1EP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロブリンB、ウシカルボニクアンヒドラーゼ、ヒトカルボニクアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のドラマメンタンおよびシトクロム

Cが含まれ、pI値はそれぞれ4.55、5.10、6.00、6.50、7.00、7.50、7.8、8.00、9.20 および 9.6であった。ゲルは PNCの指示にしたがって染色し脱色した。DEXSTAR プログラムによって両方の scFv2の種の1種として 9.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の 6.9の位置にみとめられた。

IgG、scFv2 (LHL)およびLHL) のような精製0.49溶液は、280nm波長の紫外線を分光学的に測定することによって定置した。モル吸光係数値は、各々、先に引用した Wellauerの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IlgG、CC49scFv2LHL、CC49 scFv2LHLおよびCC49scFv2のE+P (280nm)値はそれぞれ1.43、1.65、1.65 および1.71であった。

実施例4

CC49scFv2の種のLHLとLHLの相対活性を、IgGおよびGM100水腫にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合 (percent competition) を下記式によって ELISAのデータから求めた。

ゼロ競合 試料総取り量 (30 405-450nm) × 100
ゼロ競合 - 100%競合

"ゼロ競合 (zero competition)" 値は、1% BSAをジオチニル化CC49 (8×10⁻¹⁴モル) と 1:1比率で混合して測定し、一方 100%競合はジオチニル化 CC49IlgGと混合した CC49IlgGの5 μg/ml試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は 402nm-450nmで測定した。3回の試料取り量の平均値を使用した。最初に試料 (25 μL) を、TAG-72でコートしたマイクロリヤトルプレートに、1.0×10¹⁰ ールの結合部位/mlで塗布した。ジオチニル化CC49 (4 μg/μl 1:20,000に希釈、25 μl使用) で試料を1/2濃度に希釈した。選択性試験 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は IgGには等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Pabフラグメントと比較した。両者は一致であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二種の両者の形質は、二つの充分に

機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の型に比べて IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IlgGの型と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層浸透的な体内分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既述の scFv2分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ同時に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている説明を實施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の請求の範囲によって示される。

以上

請求の範囲

1. 2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含む成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala His
Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド;及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多量の一本鎖抗体。

2. 前記軽鎖可変領域が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Trp Glu Asp Leu Ala
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と實質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記軽鎖可変領域が下記の配列

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
 Gly Glu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を有している。請求項1記載の多量の一価鎖抗体。

3. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する。
 請求項1記載の多量の一価鎖抗体。

4. 多量の一価鎖抗体をコードする DNA配列であって、この多量の一価鎖抗体が2本以上の一価鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する結合能を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されておき、そして各フラグメントは：

- (a) 抗原可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 抗原可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを親和的な結合位成分へと連絡せしめる

第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAC ATG CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTC TCA
 CTT GCC GAG AAG GTT ACT TTC AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC
 CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC
 CAC CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG
 GCA TCC GCT AGC GAA TCT CCG GTC CCF GAT CCG TTC AEA GGC
 AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ALT CTC TCC ATC AGC AGT GTC
 AAG ACT GAA GAC CTG GCA GGT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
 AGC TAT CCC CTC ACC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG CTG CTG
 AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

CAC GTT CAG TTC CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTC GTG AAA CCT
 GGU GCT TCA CTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
 TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG CTG AAA CAG AAC CTT GAA
 CAC CCC CTC GAA TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GCA AAT CAT
 GAT TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG GCC AAG CCC ACA CTG
 ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GTG CAG CTC AAC
 AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GCG TAT TTC TGT ACA AGA
 TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA CTC ACC
 GTC TCC TCA

と実質的に同じである。請求項1記載の DNA配列。